LC-2000 Plus (日本分光) 取り扱いマニュアル

2011/03/10 文責: 東 恵理子

- GPC カラムは非常に高価です。**絶対に枯らさないこと。**操作が完了するまで、細心の注意をはらって取り組むこと。

―・―・―・―・―・―・―・―・―・―・―・―・―・―・―・―・―

- ゲルは、GPC H-2001 と GPC H-2002 (Shodex) が連結されています。
- 分子量 5000 まで対応しています。
- 溶媒はクロロホルムを用います。
- サンプル量は最大 300 mg 程度です。はじめは少量で行うとよい。

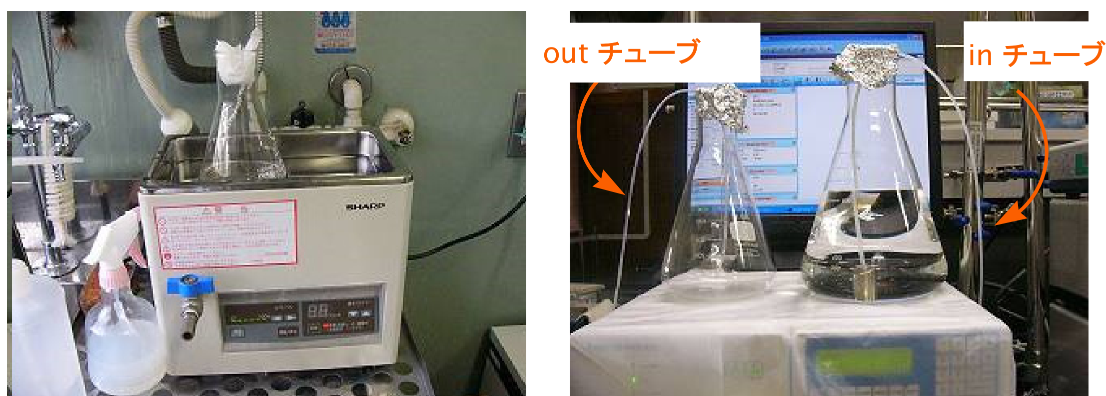
1. 溶媒の準備

① 吸引ビン、ミリポワメンブレンフィルターを用いてクロロホルムをろ過する。(1 リットルビンに 600-1000 ml ほどあるとよい。)



② ろ過したクロロホルムを三角フラスコに移し、超音波で約 1 分間、脱気する。

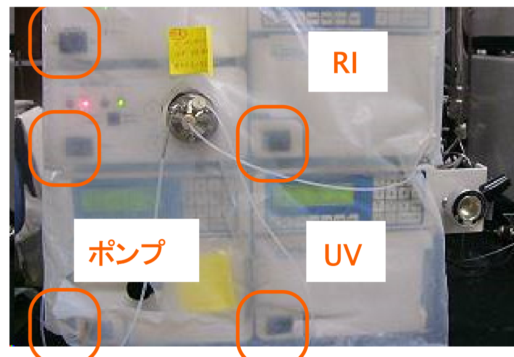
③ ビンに入れて本体の in チューブを入れる。



2. 測定準備

① PC の主電源、HPLC 本体の電源を入れる。本体が立ち上がったら、エラーなどがないか確認する。RI の Intensity Poor Warning の解決方法は最後にのせてある。

①. PC の電源 ON。本体の電源 5 ヶ所 ON。



② パージする。

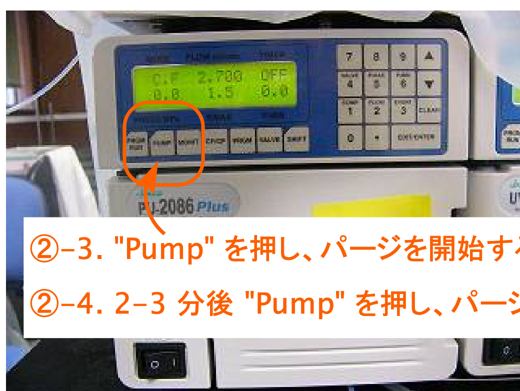
1. ドレインチューブを廃液タンクに入れる。ポンプ本体のドレインバルブを<u>左に回して開く</u>。(ポンプから直接ドレインにつながる。)
2. 本体の右下の “<u>Edit</u>” を押し、”<u>7.0</u>” と入力し、流速を 7.0 ml/min に変更する。”<u>Enter</u>” で決定。



②-1. ドレインバルブを左に回して開ける。

②-2. "Edit" を押し、流速が点滅したら "7.0" ml/min に変更する。"Enter"。

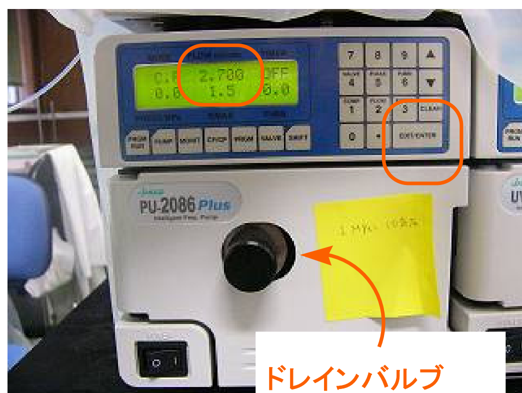
3. 左下 2 番目の “<u>Pump</u>” を押し、パージを開始する。約 2-3 分で OK。
4. ”<u>Pump</u>” でとめる。



②-3. "Pump" を押し、パージを開始する。

②-4. 2-3 分後 "Pump" を押し、パージを終了する。

5. ”**Edit**”, “**2.5**”（実際に行う流速を入力）, “**Enter**” で元の流速に戻す。注：カラムに 7.0 mi/min で流すと確実に圧力オーバーでカラムが壊れる可能性あり。必ず戻す。
6. ドレインバルブを**右にあたるまで回して**閉じる。(カラム、検出器を通るパスになる。)



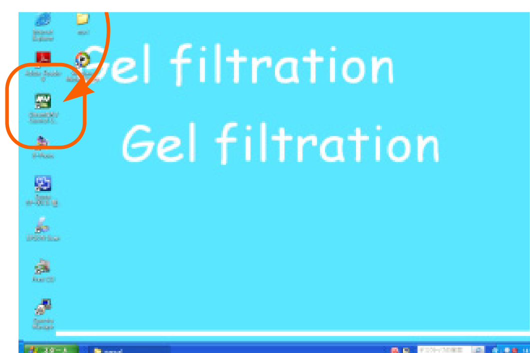
②-5. "Edit" を押し、流速が点滅したら元の流速に変更する。"Enter"。

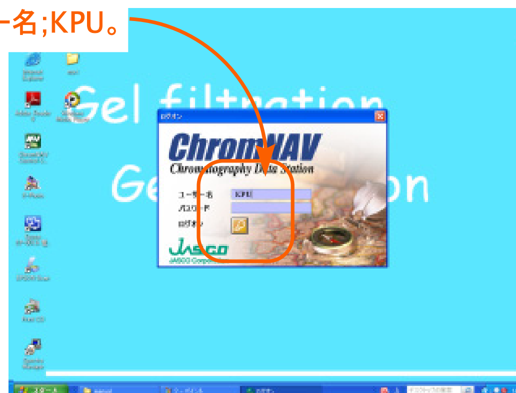
②-6. ドレインバルブを右にあたるまで回して閉じる。

③ PC ソフトを開く。

1. デスクトップ上の アイコン **ChromNAV** をダブルクリック。ユーザー名：**KPU**，パスワード：なし、でログインする。
   - ＊ ”期限が切れていますエラー” でログインできないときは、ユーザー名：KPU，パスワード：なし、を再度設定すると入れる。

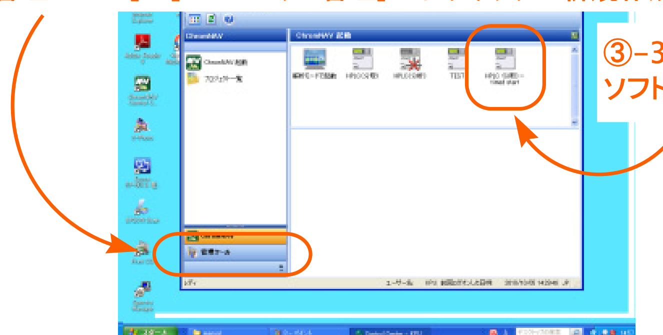
③-1. ChromNAV をダブルクリック。ユーザー名;KPU。





2. 初めて使用する人は自分用のプロジェクトを作成する。[管理ツール]→[プロジェクト管理]→右クリックで新規作成。
3. 通常の精製の際は、<u>HPLC (ゲルろ過) – timed start</u> を選択する。999 min 以下の測定のときは <u>HPLC (ゲルろ過)</u> でもよい。

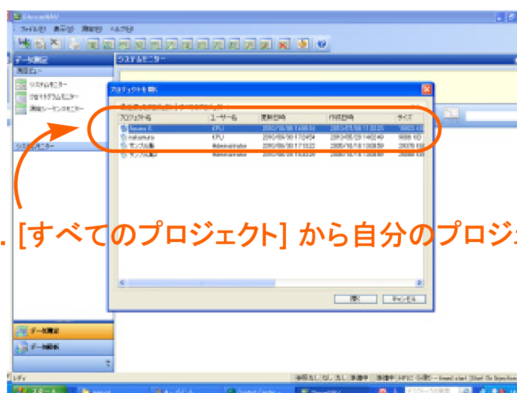
③-2. 初めて使用する人は自分のプロジェクトを作成する。
[管理ツール]→[プロジェクト管理]→右クリックで新規作成。



③-3. HPLC (ゲルろ過) –timed start で
ソフトを立ち上げる。

HPLC (ゲルろ過):サンプルインジェクトと同時に測定を開始するシステム。
HPLC (ゲルろ過ーtimed start):Start ボタンを押したときから測定を開始するシステム。

4. [すべてのプロジェクト]から自分のプロジェクトを開く。



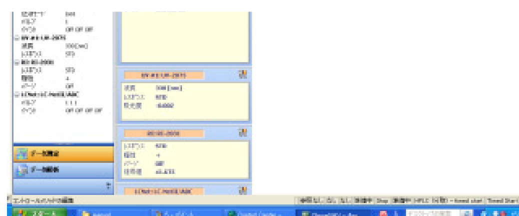
③-4. [すべてのプロジェクト] から自分のプロジェクトを開く。

④ 測定条件の設定—コントロールメソッドを作成する。

1. **コントロールメソッドの編集** をクリック。(あらかじめ作成したコントロールメソッドを編集する場合はそれを開く。)

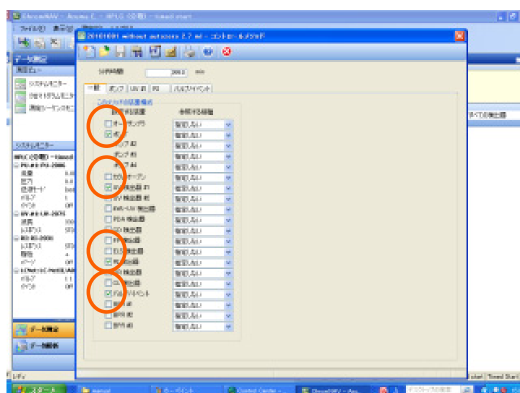


④-1. [コントロールメソッドの編集] をダブルクリック。

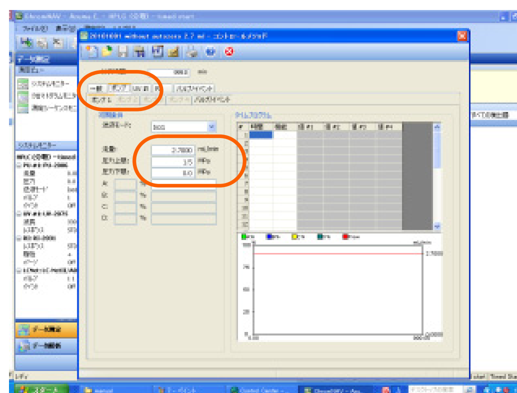


2. 一般:**ポンプ**、**UV 検出器 #1**、**RI 検出器**、**バルブ/イベント** の 4 つにチェックを入れる。
3. ポンプ:流量;**流量**を設定する。1.5-2.0 ml が目安です。圧力上限;3.5 MPa、圧力下限;0.0 MPa。

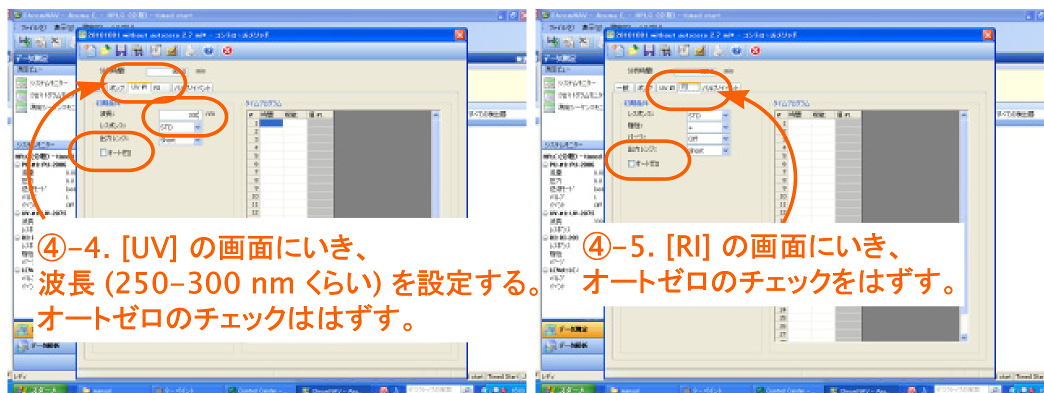
④-2. [ポンプ], [UV], [RI], [バルブイベント] にチェックを入れる。



④-3. [ポンプ] の画面にいき、流量 (1.5-2.0 ml/min) と圧力上限 (3.5 MPa) を設定する。

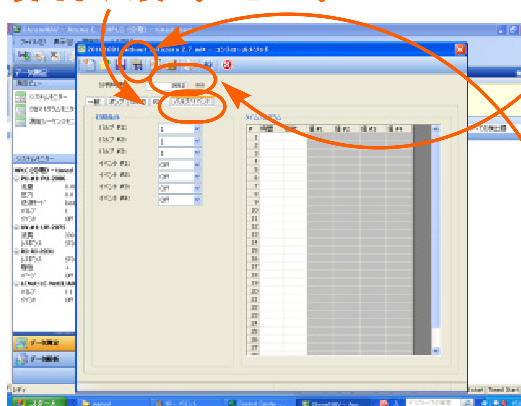


4. UV：波長を設定する。レスポンス：STD、出力レンジ：Short。オートゼロは、1 回の測定ごとにオートゼロにするか否かの選択であるため、HPLC (timed start) において連続で測定するときは必ずチェックを外しておく。999 min 以内に測定が終わるときはどちらでもよい。測定開始時に手動でもオートゼロできる。
5. RI：レスポンス：STD、極性：＋、パージ：Off、出力レンジ：Short。オートゼロの扱いは UV と同じ。



6. バルブ/イベント：1、Off。
7. 分析時間：999 min に設定。
8. 名前をつけて保存する。
9. 閉じる。

④-6. [バルブイベント] の画面は、
変えなくて良い。1 と Off。



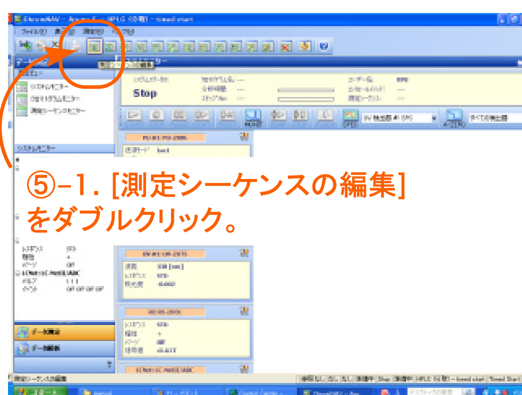
④-7. 分析時間 999 min にする。

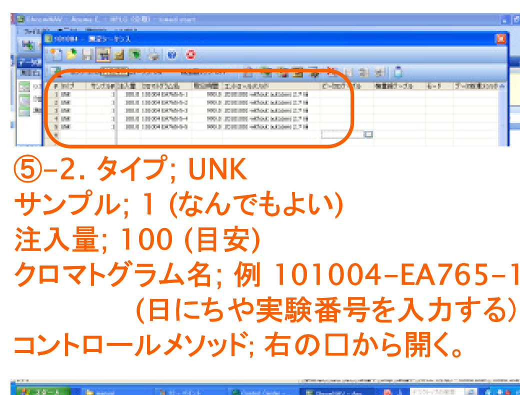
④-8. [名前をつけて保存] する。

④-9. 画面を閉じる。

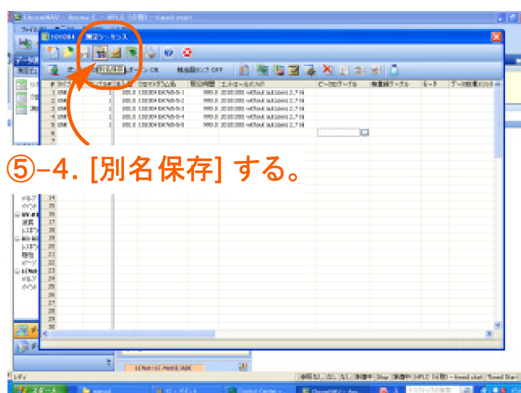
⑤ 測定シーケンスの編集。

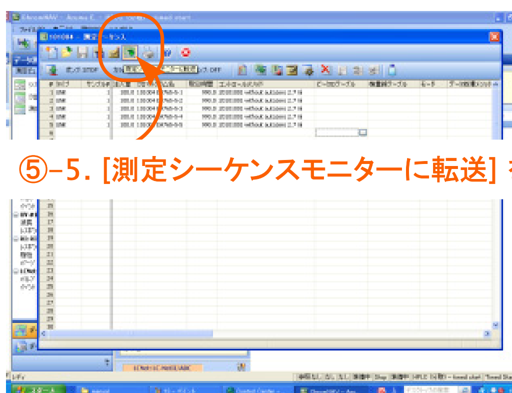
1. 測定シーケンスの編集をクリック。(あらかじめ作成したコントロールメソッドを編集する場合はそれを開く。ただしクロマトグラム名は変更しないといけない。)
2. タイプ:UNK、サンプル:1 (なんでもよい)、注入量:100.0 (ただの目安)、クロマトグラム名:この名前で保存されるので**日にちや実験番号を入力**する。すべて違う名前にする。取り込み時間:分析時間 999 min より短い時間にする。**990 min** など。コントロールメソッド:セル内の右側のボタンから先ほど作成したコントロールメソッドを開く。
3. 999 min で分離できるときは 1 行で OK。999 min 以上リサイクルするときは複数行にわたって入力する。





4. **保存**する。
5. 測定シーケンスモニターに転送をクリック。

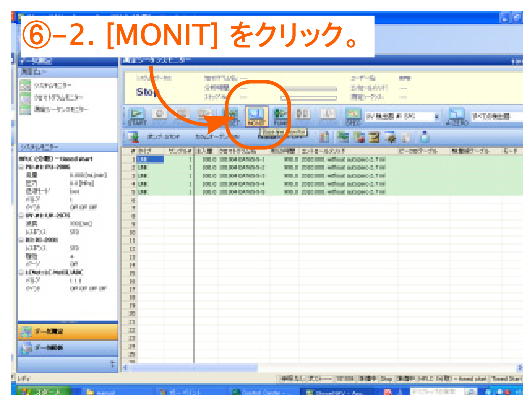




⑥ ベースラインをモニターする。

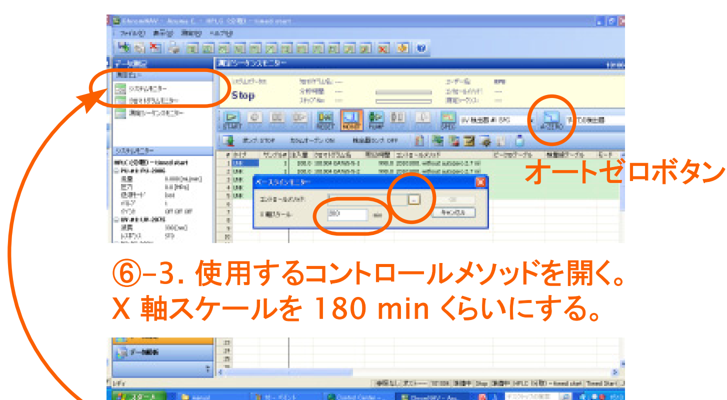
1. in 側のチューブが十分量の溶媒に浸っていることを確認し、out 側のチューブが別のビンに入れてあることを確認する。流路は、A (排出するパス) or B (リサイクルするパス)。内部の溶媒を新しいものに置換したいときは A (排出するパス)。
2. <u>MONIT</u> をクリック。





a. オートからマニュアルに切り替える。
b. A (排出するパス) or B (リサイクルするパス)
を切り替えられる。

3. 測定するコントロールメソッドを選択する。X 軸スケールは 180 min などに設定。OK。
4. クロマトグラムモニターでベースラインをモニターする。ベースラインの多少のブレはあるので、完全にベースが整うまで待つ必要はない。20–40 分が目安です。手動でオートゼロにする設定のときは右上のオートゼロをクリック。



⑥-4. クロマトグラムモニターでベースラインをモニターする。

5．ベースラインがいい具合になったら、流路を B (リサイクル) に切り替える。


⑥–4. ベースラインが整ったら、流路を B (リサイクル) にする。

3. 測定

1．サンプルを流路に流す用のクロロホルム (5 ml 以下) に溶かし、PTFE フィルターでろ過する。



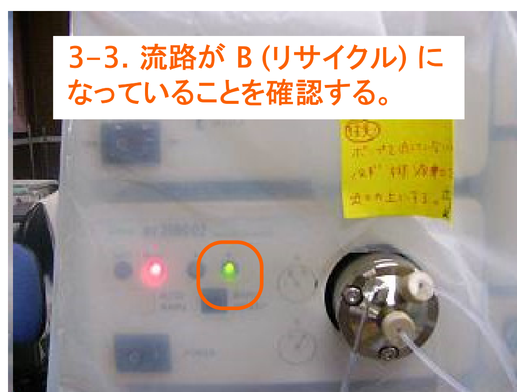
3–1. サンプルをクロロホルムに溶かし、PTFE フィルターでろ過する。

2．サンプル全量が入るガスタイトシリンジを準備する。サンプルを吸い、空気を抜く。

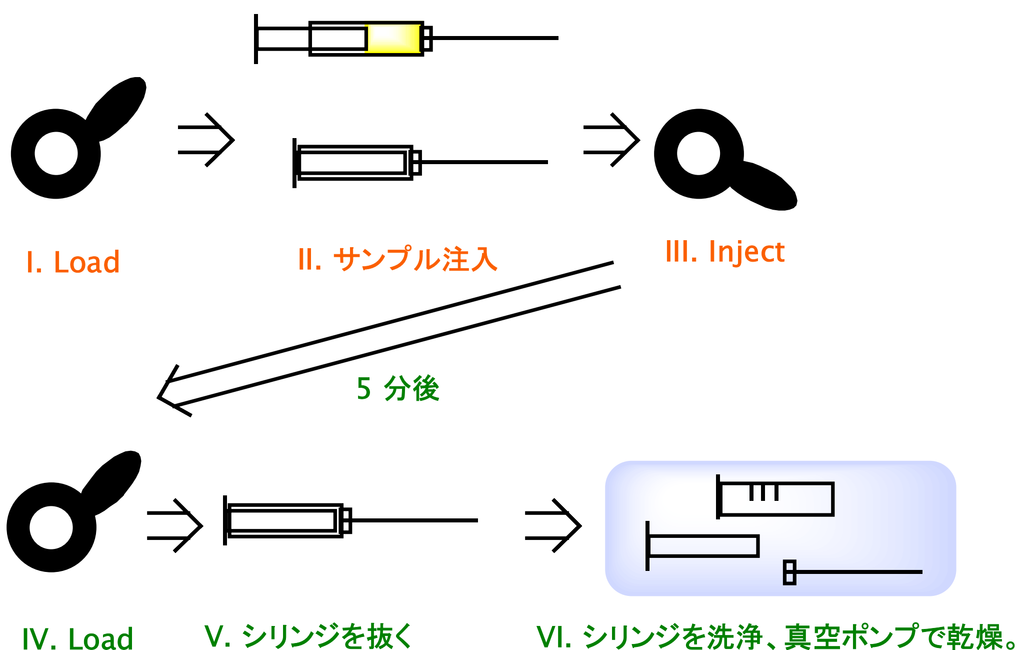

3–2. サンプルが全量入るガスタイトシリンジに入れ、空気抜きをする。

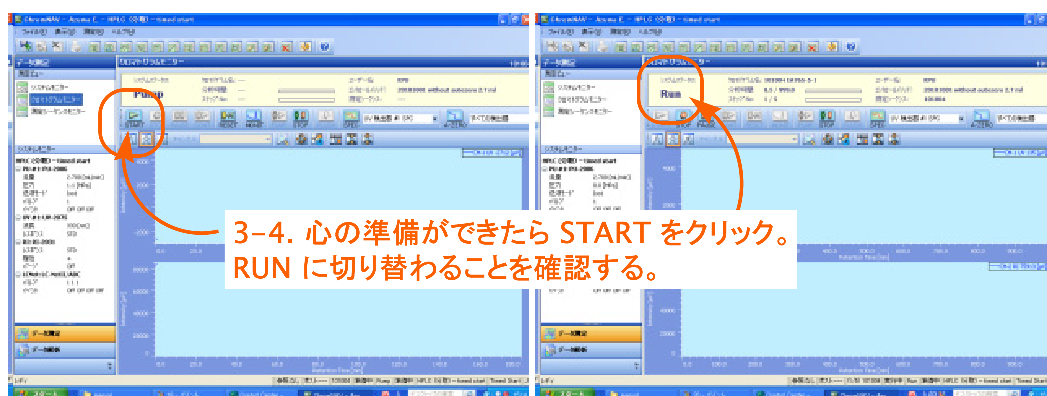
3. サンプルをうつ準備ができたら、流路がリサイクル（B）になっていることを確認する。

4. START をクリック。左上、システムステータスの表示が Pump から Run に変わる。この操作で測定が開始される。



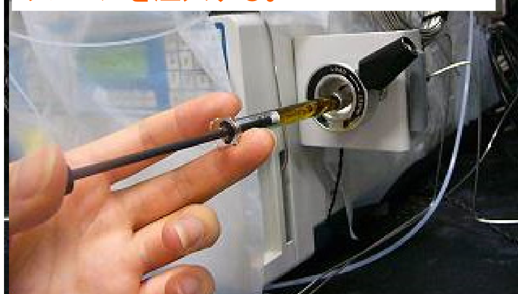
［チャージの基本］ —インジェクターの仕組みは付録に—





5. インジェクターが Load になっていることを確認し、シリンジをインジェクターに差し込む。
6. サンプルを注入する。すぐに Inject に切り替える。
   ＊ サンプル溶液が流路に全て入るまでシリンジは抜かない。
   ＊ シリンジを抜くときは Load に切り替えてから抜く。


3-5. インジェクターが Load になっていることを確認しシリンジを差し込む。


3-6. インジェクターの後ろ側から出てくるかもしれない溶媒を受けながらサンプルを注入する。

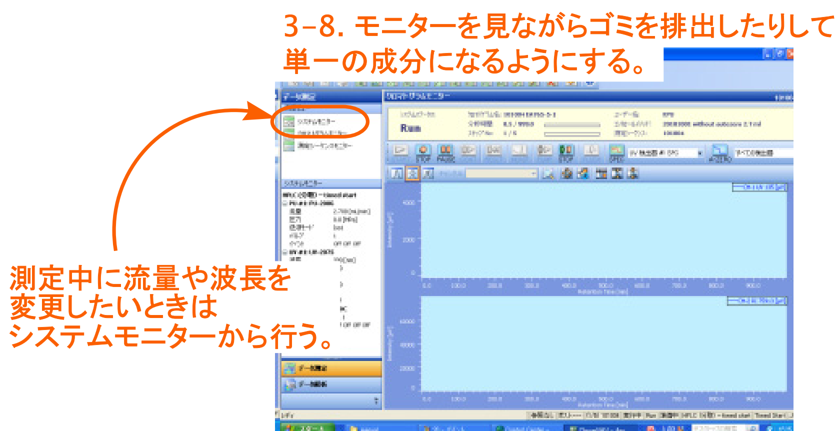

その後すぐに Inject に切り替える。

7. シリンジはサンプル溶液が流路に全て入ってから Load に切り替えて抜く。流速 2 ml/min で溶媒を流していて、4 ml のサンプルを注入したのなら、2 分以上経ってから抜く。だいたい 5 分もすれば抜いてよい。シリンジはアセトン等で洗浄後、真空ポンプで乾燥させる。

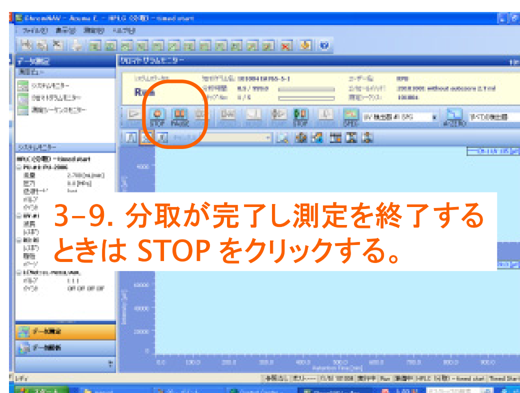

3-7. 5 分後くらいに Load にしてからシリンジを抜く。

8. モニターを見ながら、ゴミを落としたりして、目的のピークが単一の成分になるようにする。流路から出すときは（A)、リサイクルするときは（B）ボタンで切り替える。

＊ 測定途中で流量や波長を変更したいときは、システムモニターから行う。

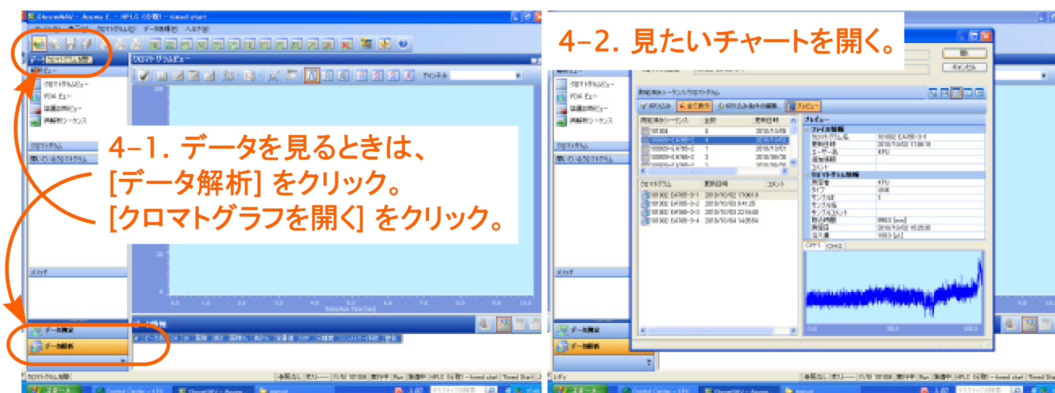


9. 分取が完了し、測定を終了するときは Stop をクリック。モニター画面に行き、最低 1 サイクルは溶媒を排出して、内部に化合物が残らないようにする。ベースラインが整ったらポンプを切る（Pump stop)。



4. データを見る・解析

1. 左下の**データ解析**をクリック。**クロマトグラフを開く**をクリック。
2. 見たいチャートを開く。



5. かたづけ

① ソフト ChromNAV Off。
② 機器を Off。
③ PC Off。
④ out 側の溶媒は捨てておく。
⑤ 使用記録簿記入。以上おつかれさまでした。

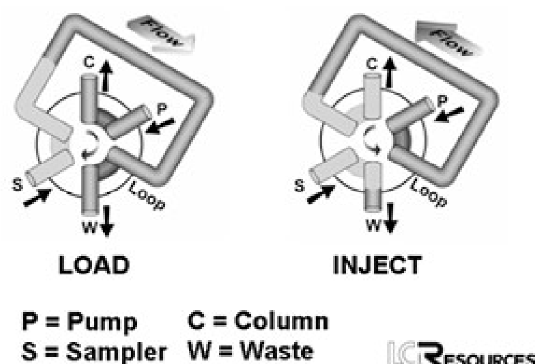
[付録]

・インジェクターのしくみ

LOAD;
送液ポンプとカラムが直結しており，この状態でサンプルがサンプルループの中へ押し込まれる。

INJECT;
移動相はサンプルループ内部を通過し，サンプルと共にカラムへ流れこむ。

Design：Partial-Loop Injection



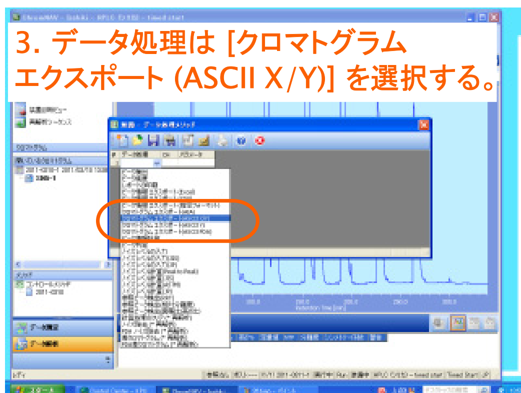
・　RI の Intensity Poor Warning の解決方法 [取扱説明書の 4-2 を参考にするとよい。]
RI の流路に気泡が入り、SAM 値が 0.1 以下になるとエラーとなる。そのため気泡を抜く作業を行う。

1. Clear ボタンで Warning メッセージを消す。
2. 流路を A に切り替える。
3. ポンプを ON にして溶媒を流す。
4. RI の Purge ボタンを押す。Purge を ON にするために 1 を押す。MONIT ボタンで画面を切り替えると Purge が ON か OFF かを確認できる。
5. Warning 画面が消えれば OK。
6. Purge ボタンを押して 2 を選択し Purge OFF に戻しておく。

・　ASCII ファイルへの変換方法

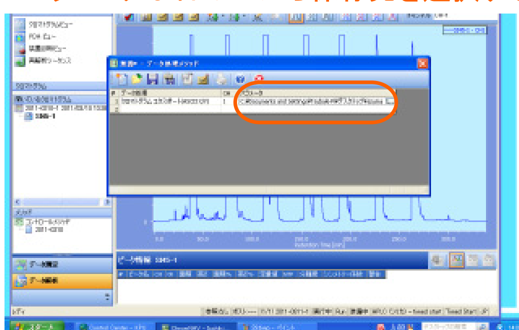
1. 4-1, 2 を参考にデータ解析からクロマトグラフを開く。

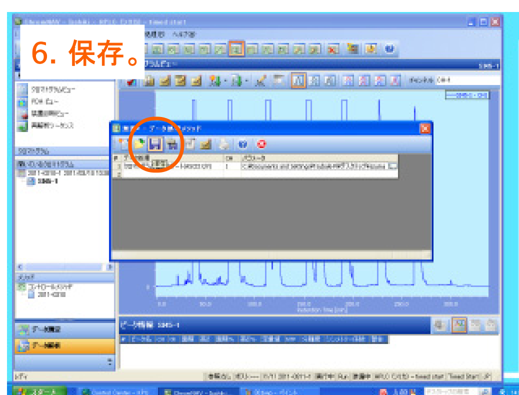


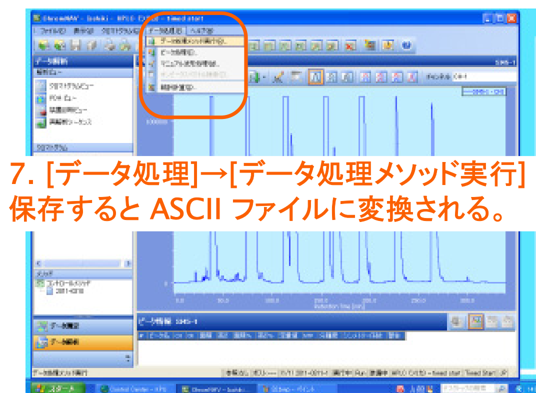




5. パラメータは右の口から保存先を選択する。







・　ニードルポートの洗浄

1. サンプルを打ったシリンジを抜き、、洗浄用の針なしシリンジできれいな溶媒を INJECT の状態で打つ。

2. ニードルポートの洗浄が終わったら、インジェクターを LOAD に戻す。この方がサンプルループ分の拡散がなくなるので INJECT のままよりもサンプルが速く流れるはず。